

**PCT**  
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina Internacional  
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> : <b>C02F 3/34, 3/12, B09C 1/10, C12N 1/20</b> <b>// (C12N 1/20, C12R 1:22)</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Número de publicación internacional: <b>WO 95/01311</b></p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: <b>12 de Enero de 1995 (12.01.95)</b></p>
<p>(21) Solicitud internacional: <b>PCT/ES94/00069</b></p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: <b>1 de Julio de 1994 (01.07.94)</b></p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad:  <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 9301496</div> <div>2 de Julio de 1993 (02.07.93)</div> <div>ES</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 9401427</div> <div>30 de Junio de 1994 (30.06.94)</div> <div>ES</div> </div> </p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): <b>UNION ESPAÑOLA DE EXPLOSIVOS S.A. [ES/ES];</b> <b>Avenida del Partenón, 16, Campo de Las Naciones, E-28042</b> <b>Madrid (ES).</b></p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): <b>RAMOS MARTIN, José</b> <b>Luis [ES/ES]; Los Rosales, 14, E-18191 Pinos Genil (ES).</b> <b>PIÑAR LARRUBIA, Guadalupe [ES/ES]; Parque del Genil,</b> <b>Edificio Granate 4, B-2, E-18004 Granada (ES). DUQUE</b> <b>MARTIN DE OLIVA, Estrella [ES/ES]; Los Rosales, 14, E-</b> <b>18191 Pinos Genil (ES). HAIDOUR, Ali [MA/ES]; Casillas</b> <b>del Prats, 12, E-18002 Granada (ES).</b></p> <p>(74) Mandatario: <b>GARCIA CABRERIZO, Francisco; Vitruvio, 23,</b> <b>E-28006 Madrid (ES).</b></p>		
<p>(81) Estados designados: <b>AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN,</b> <b>CZ, DE, DK, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV,</b> <b>MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK,</b> <b>UA, US, UZ, VN, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK,</b> <b>ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente</b> <b>OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,</b> <b>SN, TD, TG).</b></p> <p><b>Publicada</b> <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Antes de la expiración del plazo previsto para la modifi-</i> <i>cación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente</i> <i>si se reciben tales modificaciones.</i></p>		

**WITH TRANSLATION  
ATTACHED**

(54) Title: **PROCESS FOR THE BIOLOGICAL ELIMINATION OF NITRATES AND/OR NITRITES USING STRAINS OF KLEBSIELLA OXYTOCA**

(54) Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA ELIMINACION BIOLOGICA DE NITRATOS Y/O NITRITOS UTILIZANDO CEPAS DE KLEBSIELLA OXYTOCA**

**(57) Abstract**

Two new strains of *Klebsiella oxytoca* have been isolated, identified as *K. oxytoca* clone-15 and clone AH1, which are capable of using nitrates and/or nitrites as nitrogen source and, consequently may be used for the biological elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluents, waters and grounds contaminated by said substances, through a process which comprises the inoculation of cultures of said strains into said effluents, waters and grounds contaminated of cultures of said strains. The strain *K. oxytoca* clone-15 is capable of using, both in aerobic and anaerobic conditions, nitrates and/or nitrites present in a concentration up to 100 mM, whereas the strain *K. oxytoca* clone AH1 is capable of using, in aerobic conditions, nitrates present in a concentration up to 400 mM. The process applies to the elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluents, waters and grounds which have been contaminated.

**(57) Resumen**

Se han aislado dos nuevas cepas de *Klebsiella oxytoca*, identificadas como *K. oxytoca* clón-15 y clón AH1, que son capaces de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de nitrógeno, por lo que pueden ser utilizadas para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes industriales, aguas y suelos contaminados por dichos compuestos, mediante un procedimiento que comprende la inoculación de dichos efluentes, aguas y suelos contaminados con cultivos de dichas cepas. La cepa *K. oxytoca* clón-15 es capaz de utilizar, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, nitratos y/o nitritos presentes en una concentración de hasta 100 mM, mientras que la cepa *K. oxytoca* clón AH1 es capaz de utilizar, en condiciones aeróbicas, nitratos presentes en una concentración de hasta 400 mM. El procedimiento tiene aplicación en la eliminación de nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes industriales, aguas y suelos contaminados.

### UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	GB	Reino Unido	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Níger
BE	Bélgica	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	HU	Hungría	NO	Noruega
BG	Bulgaria	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BJ	Benin	IT	Italia	PL	Polonia
BR	Brasil	JP	Japón	PT	Portugal
BY	Belarús	KE	Kenya	RO	Rumanía
CA	Canadá	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CG	Congo	KR	República de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KZ	Kazajistán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LE	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LV	Letonia	TG	Togo
CZ	República Checa	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DE	Alemania	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tobago
DK	Dinamarca	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Malí	US	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
FR	Francia			VN	Viet Nam
GA	Gabón				

PROCEDIMIENTO PARA LA ELIMINACION BIOLOGICA DE NITRATOS  
Y/O NITRITOS UTILIZANDO CEPAS DE KLEBSIELLA OXYTOCA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a nuevas cepas de Klebsiella oxytoca adecuadas para su empleo en un procedimiento para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos. En particular, la invención proporciona un procedimiento para la eliminación de nitratos y/o nitritos contenidos en  
10 efluentes industriales o urbanos y en suelos, mediante el empleo de cepas de Klebsiella oxytoca capaces de utilizar dichos compuestos como fuente de nitrógeno, evitando de esta manera la contaminación medioambiental producida por dichos compuestos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La industria en general, y en particular, la industria de explosivos fabrica grandes cantidades de diversos compuestos sustituidos con grupos nitro que se  
20 utilizan como explosivos y propelentes. Los efluentes de lavado de plantas de nitración de diversos compuestos contienen altas cantidades de nitratos y niveles detectables de nitritos, que si no se tratan de manera adecuada, constituyen una fuente de contaminación  
25 medioambiental por lo que deben ser eliminados ya que los primeros, a concentraciones moderadas, son tóxicos y los segundos, agentes mutagénicos, y, por tanto, agentes sospechosos de inducir cáncer.

Los efluentes de fábricas de explosivos,  
30 especialmente de aquéllas productoras de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), nitroetilenglicol y nitroglicerina, presentan bajos niveles de los nitroorgánicos mencionados y altos niveles de nitratos, amén de un pH ácido (valores entre 1 y 2).

35 Los sistemas actuales de tratamiento de los efluentes

procedentes de plantas de fabricación de explosivos incluyen fundamentalmente la neutralización de las aguas y la dilución al infinito de los mismos con agua. Este tratamiento conlleva un problema de adición continuada de  
5 contaminantes a ríos, aguas subterráneas y suelos, por lo que no resulta adecuado.

La microbiología en general y la biotecnología en particular, pueden ofrecer una alternativa biológica a la eliminación de nitratos y nitritos mediante la utilización  
10 de los mismos como fuente de N por microorganismos adecuados. Así, en varios estudios se recoge la posibilidad de tratar biológicamente efluentes que contienen nitratos. Entre estos trabajos cabe destacar los siguientes:

15

- Kaplan et al. (*International Biodeterioration*. 23: 233-248, 1987) utilizaron microorganismos no definidos lo cual genera problemas de reproducibilidad de tratamiento;
- 20 - Hensen Christensen y Harremoes (*Prog. Wat. Tech.* 8: 509-555, 1977) revisan el estado de la técnica en plantas de tratamientos con cargas bajas de nitrato;
- du Toit y Davies (*Water Res.* 7: 489-500, 1973) estudian la eliminación de nitratos en flujo continuo  
25 con residuos domésticos con baja carga de nitrato;
- Hochstein y Tomlinson (*Annu. Rev. Microbiol.* 42: 231-261) revisan el proceso de desnitrificación desde distintos puntos de vista; y
- Ye et al. (*Applied Environmental Microbiology* 59: 250-254, 1993) muestran la versatilidad de enzimas  
30 implicados en los procesos de desnitrificación.

Sería conveniente, por tanto, disponer de microorganismos capaces de utilizar los nitratos y/o  
35 nitritos presentes en los efluentes de las plantas de

fabricación de explosivos, como fuente de N, al objeto de efectuar una eliminación biológica de los mismos, superando los inconvenientes anteriormente citados y evitando de este modo los problemas medioambientales asociados con el vertido incontrolado de dichos efluentes o con su tratamiento inadecuado.

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye el aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de eliminar nitratos y/o nitritos.

10 Tales microorganismos, pertenecientes a dos cepas de Klebsiella oxytoca, constituyen un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes industriales, aguas residuales urbanas o suelos, mediante el empleo de los microorganismos proporcionados por esta invención.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

20 La invención proporciona nuevas cepas de Klebsiella oxytoca capaces de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de nitrógeno, así como un procedimiento para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes industriales, aguas residuales urbanas y suelos, mediante el empleo de las cepas de Klebsiella oxytoca proporcionadas por esta invención.

A modo de resumen, la invención comprende, por una parte, el aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de N, y por otra, el empleo de los microorganismos aislados para la eliminación de nitratos y/o nitritos presentes en efluentes de plantas industriales, en aguas residuales urbanas y en suelos contaminados con dichos compuestos.

35 1. Aislamiento y caracterización de microorganismos

capaces de utilizar nitratos y/o nitritos.

1.1 Aislamiento

Para el aislamiento de microorganismos capaces de utilizar nitrato como fuente de N se procedió del siguiente modo. Una muestra de un suelo próximo a una planta generadora de efluentes cargados con nitratos se suspendió en un medio de cultivo mínimo del tipo M8 [el medio M8 es idéntico al medio M9 excepto en que se omite la fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )]. La composición del medio M9 se describe en Abril et al., *Journal of Bacteriology*, Vol. 171, No. 12, págs. 6782-6790, (1989). A dicha suspensión se añadió un volumen del agua efluente de la fábrica, rica en nitratos, y una cantidad adecuada de una fuente de C. Como fuente de C puede utilizarse un azúcar, preferentemente fructosa o glucosa, o un ácido orgánico adecuado, preferentemente ácido acético o succínico, o alcoholes del tipo de la glicerina y el etilenglicol. Posteriormente se incubó la suspensión resultante a temperaturas comprendidas entre 15°C y 42°C, preferentemente entre 25°C y 30°C, con agitación opcional, y, tras una semana de incubación, se siembran diluciones apropiadas en placas de medio sólido selectivo tal como el constituido por M8, agar noble, nitrato potásico (20-100 mM) y una fuente de C. Tras un periodo de incubación comprendido entre 24 h y una semana las colonias aisladas se purifican y su capacidad para crecer a expensas de nitratos y/o nitritos se comprueba en medio líquido. En el Ejemplos 1 se describe el aislamiento de bacterias capaces de utilizar nitrato como fuente de N, en particular, de las dos cepas de Klebsiella oxytoca de esta invención.

1.2 Caracterización de los microorganismos aislados

Siguiendo análisis tipo [Test API 20E, de Biomerieux, Francia, n° de referencia del catálogo 20.100] se ha podido verificar que los microorganismos aislados capaces

de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de N, eran bacterias pertenecientes al género Klebsiella. Dos de las cepas aisladas más eficientes fueron las denominadas Klebsiella oxytoca clón-15 y Klebsiella oxytoca clón AH1, que han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, España, los días 15 de Junio de 1993 y 10 de Junio de 1994, correspondiéndoles los números de accesoión CECT 4460 y CECT 4500, respectivamente.

Las bacterias aisladas presentan forma bacilar, y no presentan pigmentación cuando se cultivan en placas de medio mínimo o medio rico en LB (*Maniatis et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982*). Una de las cepas aisladas, concretamente, la denominada Klebsiella oxytoca clón-15, en medio mínimo tipo M8 puede utilizar fructosa, glucosa, ácido acético, ácido succínico y glicerol como fuente de C y amoníaco, nitrato y nitrito como fuente de N, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, mientras que la otra cepa aislada, la denominada Klebsiella oxytoca clón AH1, puede utilizar nitrato y nitrito como fuente de N y etilenglicol como fuente de C en condiciones aeróbicas.

Las características taxonómicas comunes de las cepas Klebsiella oxytoca clón-15 y Klebsiella oxytoca clón AH1 son las siguientes:

1. Características morfológicas

Forma: Bacilar

Movilidad: No móvil

Esporas: No forman

Tinción Gram: Negativa

2. Características de cultivo

Cultivo en medio Mac Conkey: Crecimiento

Siembra en placas de agar nutritivo: Crecimiento

Siembra en tubo inclinado de agar nutritivo:  
Crecimiento

3. Características fisiológicas

- 5      pH: 6.0-10.5 (para K. oxytoca clón-15)  
         6.0-8.0 (para K. oxytoca clón AH1)  
         Temperatura: 15°C-42°C  
         Comportamiento frente al O<sub>2</sub>:  
             ambas son anaeróbicas facultativas, pero la cepa  
10      K. oxytoca clón AH1 sólo utiliza etilenglicol  
             como fuente de C en aerobiosis  
         β-galactosidasa: Positiva  
         Arginina dehidrolasa: Negativa  
         Lisina descarboxilasa: Positiva  
15      Ornitina descarboxilasa: Negativa  
         Utilización de citrato: Positiva  
         Producción de H<sub>2</sub>S: Negativa  
         Ureasa: Positiva  
         Triptófano desaminasa: Negativa  
20      Producción de indol: Positiva  
         Gelatinasa: Negativa  
         Fermentación/oxidación de azúcares:  
             Glucosa: Positiva  
             Manitol: Positiva  
25      Inositol: Positiva  
             Sorbitol: Positiva  
             Ramnosa: Positiva  
             Sacarosa: Positiva  
             Melibiosa: Positiva  
30      Amigdalina: Positiva  
             Arabinosa: Positiva  
         Citocromo oxidasa: Negativa  
         Producción de NO<sub>2</sub>: Positiva  
         Reducción a gas N<sub>2</sub>: Positiva



La cepa Klebsiella oxytoca clón-15 es capaz de crecer en presencia de altas y bajas cargas de nitratos y/o nitritos. Una característica de esta cepa es el hecho de que es capaz de crecer en presencia de relativamente altas concentraciones de nitratos (hasta 100 mM), lo que le da un carácter muy particular y constituye una ventaja fundamental para su aplicación en la eliminación de nitratos y/o nitritos presentes en efluentes, aguas residuales y suelos.

10 Por otra parte, la cepa Klebsiella oxytoca clón AH1 es capaz de crecer en presencia de altas cargas de nitratos, a concentraciones del orden de 225 mM en sistemas estancos, por lo que es muy adecuada para la eliminación de nitratos y/o nitritos presentes en efluentes, aguas residuales y suelos.

Dado que la vía de asimilación del nitrato incluye, entre otras reacciones, la reducción del nitrato a nitrito y amoníaco, se estudió la posibilidad de que las cepas aisladas fueran capaces de asimilar nitritos, observándose que dichas cepas son capaces de utilizar nitritos como fuente de N, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas [Klebsiella oxytoca clón-15], tal como se describe en los Ejemplos 2 a 19, como en condiciones aeróbicas [Klebsiella oxytoca clón AH1], como se describe en los Ejemplos 20 a 22.

Una vez aisladas y purificadas las colonias de bacterias capaces de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de N, éstas pueden utilizarse para eliminar dichos compuestos presentes en efluentes de plantas industriales, en aguas residuales urbanas y en suelos.

## 2. Procedimiento de eliminación biológica de nitratos y/o nitritos.

Una primera aplicación de las bacterias de esta invención, lo constituye su empleo en un procedimiento de

eliminación biológica de nitratos y/o nitritos contenidos en un efluente industrial. Dicho procedimiento comprende básicamente las siguientes etapas:

- 5       a) neutralización del efluente a tratar;
- b) suplemento de los nutrientes necesarios para el funcionamiento óptimo del procedimiento;
- c) inoculación del efluente a tratar con cultivos de microorganismos capaces de utilizar nitratos
- 10       y/o nitritos hasta la desaparición de los mismos;
- d) retirada de los microorganismos que pueden ser reutilizados en un nuevo ciclo de tratamiento de efluentes, si se desea; y
- 15       e) vertido de las aguas depuradas.

Como puede apreciarse, el procedimiento comienza con una etapa de neutralización de los efluentes. Los efluentes susceptibles de ser depurados mediante este

20 procedimiento pueden ser efluentes de cualquier proceso industrial en el que se utilicen o produzcan nitratos y/o nitritos, tales como efluentes procedentes de plantas de fabricación de explosivos. Asimismo también pueden tratarse cualquier tipo de aguas contaminadas con nitratos

25 y/o nitritos.

En general, las aguas de desecho procedentes de las plantas de fabricación de explosivos son aguas ácidas que se pueden neutralizar añadiendo cualquier álcali, preferentemente un hidróxido, carbonato o bicarbonato de

30 un metal alcalino o alcalinotérreo, al objeto de que dichas aguas alcancen un pH comprendido entre 6.0 y 10.5 tras la neutralización. Este intervalo de pH es adecuado cuando la cepa que se utiliza es la denominada Klebsiella oxytoca clón-15, mientras que si se utiliza la cepa

35 Klebsiella oxytoca clón AH1, resulta más conveniente

neutralizar el efluente y mantener el pH del mismo en un intervalo comprendido entre 6.0 y 8.0, ya que ese es su intervalo de actuación.

Posteriormente, y tras análisis del efluente  
5 neutralizado, se añaden los nutrientes necesarios tales como fosfato o cualquier otro nutriente o micronutriente que sea necesario para el óptimo funcionamiento del proceso. A modo de ejemplo, pueden añadirse cantidades adecuadas de la solución de micronutrientes A9, cuya  
10 composición se describe en Abril et al. citado supra, junto con cantidades apropiadas de Fe, Mg, Co y Mo (del orden de micromolar). En cualquier caso, la elección y cantidad de nutrientes y micronutrientes a añadir será función de la composición del efluente a tratar y de la  
15 demanda microbiológica. Adicionalmente se añade una fuente de C de las mencionadas anteriormente, apropiada para la cepa que se va a utilizar en el procedimiento.

A continuación se inoculan los efluentes neutralizados y debidamente suplementados con un cultivo  
20 de las bacterias proporcionadas por esta invención (Klebsiella oxytoca clón-15 o Klebsiella oxytoca clón AH1). La carga bacteriana puede estar comprendida entre 0.01 y 0.1 unidades de absorbancia a 660 nm por ml de cultivo, preferentemente, alrededor de 0.03 unidades de  
25 absorbancia a 660 nm por ml de cultivo.

La incubación debe realizarse a una temperatura comprendida entre 20° y 30°C con un aporte de hasta 2 litros de aire por litro de cultivo, si el procedimiento se realiza utilizando Klebsiella oxytoca clón AH1,  
30 mientras que puede no aportarse aire o pueden aportarse hasta 2 litros de aire por litro de cultivo si en el procedimiento se utiliza Klebsiella oxytoca clón-15. El curso de la incubación se sigue midiendo periódicamente la cantidad de nitrato y nitrito presente en el efluente o  
35 agua a depurar, mediante un electrodo específico de

nitrate (por ejemplo, un electrodo de nitrato del tipo Crison) y mediante un ensayo químico extremadamente sensible para la detección de nitrito (Snell y Snell, *Colorimetric Methods of Analysis*, Vol. 3, págs. 804-805, 5 Van Nostrand Co. Inc., New York, 1949) respectivamente, dándose por finalizada esta etapa una vez dejan de detectarse nitratos y/o nitritos y fuente de C.

Posteriormente se retiran las bacterias por floculación o por cualquier otro método que permita, si se 10 desea, su reutilización en un nuevo proceso y se retiran las aguas depuradas que pueden ser libremente vertidas.

Este procedimiento puede realizarse en continuo o en estanco, así como en balsas de grandes dimensiones o en fermentadores. Cuando se realiza en continuo debe 15 regularse adecuadamente el caudal y la composición del efluente de entrada y del de salida, así como la concentración de cultivo bacteriano y el aporte de nutrientes y micronutrientes necesarios.

Una segunda aplicación de las bacterias de esta 20 invención lo constituye su empleo en un procedimiento para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos en suelos superficiales contaminados con dichos compuestos. Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 25 a) inyección primaria de un cultivo de microorganismos capaces de utilizar nitratos y/o nitritos; y
- b) inyecciones sucesivas de cultivos de los microorganismos antes citados hasta que el suelo 30 quede libre de nitratos y/o nitritos.

La inyección de microorganismos se realiza para alcanzar altas densidades celulares en los suelos, del orden de  $10^5$  bacterias por  $\text{cm}^2$  de suelo, que faciliten la 35 eliminación del contaminante. Si fuese necesario se

añadiría a los suelos fosfatos y una fuente de carbono que facilite su supervivencia.

Finalmente, una tercera aplicación de las bacterias de esta invención lo constituye su empleo en la  
5 eliminación de nitratos y/o nitritos contenidos en aguas residuales siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente para la eliminación de nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes industriales.

Las ventajas derivadas de los procedimientos de  
10 eliminación biológica de los nitratos y/o nitritos de esta invención, pueden resumirse en:

- 1) presentan una alta especificidad en la eliminación de nitratos y nitritos;
- 2) funcionan en un amplio intervalo de  
15 concentraciones de nitrato, nitrito o sus mezclas, en particular, funciona a concentraciones de:
  - 0.01 a 100 mM de nitrato y de 0.01 a 50 mM de nitrito o sus mezclas, cuando el  
20 procedimiento se efectúa utilizando bacterias de la cepa Klebsiella oxytoca clón-15, o de
  - 0.01 a 225 mM de nitrato en estanco y con  
25 suplemento de hasta 400 mM de nitrato en continuo, controlando la velocidad de suministro, cuando el procedimiento se efectúa utilizando bacterias de la cepa Klebsiella oxytoca clón AH1; y
- 3) presentan una alta versatilidad, ya que pueden  
30 ser utilizados in situ para eliminar nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes de plantas industriales, aguas residuales y suelos.

A continuación se describen unos ejemplos que sirven  
35 para ilustrar realizaciones particulares de la presente

invención sin que deban ser tomados en sentido limitativo del alcance de la misma.

**EJEMPLO 1 Aislamiento de las bacterias [Klebsiella oxytoca clón-15 y Klebsiella oxytoca clón AH1]**

Una muestra de 10 g de un suelo de Páramo de Masa (Burgos) se suspendió en un medio de cultivo mínimo del tipo M8, en una relación 1:10 (p/v). Posteriormente se añadió KNO<sub>3</sub> al medio hasta alcanzar una concentración de 20 mM o de 100 mM, y de la suspensión se tomaron 3 alícuotas idénticas a las que se añadieron:

	MUESTRA	GLICEROL (g/l)	ETILENGLICOL (g/l)	FRUCTOSA (g/l)
15	I	5	---	---
	II	---	5	---
	III	---	---	5

Las suspensiones I a III resultantes se incubaron a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, con agitación opcional, durante una semana. Posteriormente se sembraron diluciones apropiadas de dichas suspensiones en placas de medio sólido selectivo constituido por medio M8, agar noble 1.5% (p/v) y

20 mM KNO<sub>3</sub> + 5 g/l de glicerol (muestra I)  
 100 mM KNO<sub>3</sub> + 10 g/l de glicerol (muestra I)  
 20 mM KNO<sub>3</sub> + 5 g/l de etilenglicol (muestra II)  
 100 mM KNO<sub>3</sub> + 5 g/l de etilenglicol (muestra II)  
 20 mM KNO<sub>3</sub> + 5 g/l de fructosa (muestra III)  
 100 mM KNO<sub>3</sub> + 5 g/l de fructosa (muestra III)

Tras incubar entre 24 horas y una semana, se purificaron las colonias aisladas y se comprobó su fenotipo cultivándolas en los medios arriba indicados.

Siguiendo los análisis del Kit API 20E (Biomérieux), las bacterias aisladas fueron clasificadas como Klebsiella oxytoca. Las dos cepas más eficientes fueron las denominadas Klebsiella oxytoca clón-15 y Klebsiella oxytoca clón AH1, que presentan las características mencionadas previamente en la descripción. Sendos cultivos de esas cepas, se depositaron los días 15 de Junio de 1993 y 10 de Junio de 1994 en la CECT correspondiéndoles los n° de accesoión CECT 4460 y CECT 4500 respectivamente.

10

**EJEMPLO 2 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas**

100 ml de medio mínimo M8 se suplementan con:

- 250 µl de solución de micronutrientes A9;
- 15 - 6 µg de citrato de hierro;
- 100 µl de solución de Mg SO<sub>4</sub> 1M;
- 20 mM KNO<sub>3</sub>; y
- 1 g de glicerol.

El cultivo se inicia añadiendo una cantidad de bacteria (Klebsiella oxytoca clón-15) tal que se alcanza una turbidez inicial a 660 nm de 0.03 unidades y se incuba a 30°C con agitación (150 rpm en un incubador orbital) y aerobiosis. Tras 24 horas de incubación la turbidez del cultivo a 660 nm está comprendida entre 1 y 2 unidades y la concentración de nitrato en el medio de cultivo es indetectable mediante análisis selectivo con un electrodo de nitrato de sobrenadante. Es igualmente indetectable la concentración de fuente de C.

**30 EJEMPLO 3 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando nitrato potásico en una concentración de 100 mM. El nitrato desapareció completamente en un plazo de 48 horas.

**EJEMPLO 4 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando agua de una factoría de manera que la  
5 concentración final en  $\text{HNO}_3$  fuera de 25-30 mM. El nitrato desapareció completamente en un plazo de 24 horas.

**EJEMPLO 5 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas**

10 Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando agua de una factoría de manera que la concentración en  $\text{HNO}_3$  fuera de 75-100 mM. El nitrato desapareció completamente en un plazo de 48 h.

15 **EJEMPLO 6 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas, en continuo**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando un sistema de adición en continuo de nitrato. El fermentador contenía 110 ml de medio y la  
20 turbidez del cultivo era del orden de 3 unidades a 660 nm. Agua de una factoría diluida para suministrar de 25 a 30 mM de  $\text{HNO}_3$ , se añadía a un flujo de 1-20 ml/h. El volumen de aire era de 0.5 volúmenes/min. El nitrato en el medio que rebosaba era indetectable.

25

**EJEMPLO 7 Utilización de nitrato como fuente de N**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, pero se utilizaron 2 litros de medio de cultivo y la incubación se realizó en un fermentador. Las condiciones  
30 de operación fueron las siguientes:

pH: 6.5-8.0

Temperatura: 25°C-35°C.

Agitación: 400-800 rpm

Aire: 0.5 volúmenes/minuto.

35

El nitrato desapareció tras 24-30 h de cultivo.



**EJEMPLO 8 Utilización de nitrato como fuente de N en anaerobiosis**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando condiciones anaeróbicas. El nitrato  
5 desapareció completamente en un plazo de 24 horas.

**EJEMPLO 9 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones anaeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 8,  
10 pero utilizando nitrato potásico a una concentración de 100 mM. El nitrato desapareció completamente en un plazo de 48 horas.

**EJEMPLO 10 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones anaeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, pero utilizando agua de una factoría hasta alcanzar una  
concentración en  $\text{HNO}_3$  de 25-30 mM. El nitrato desapareció  
completamente en un plazo de 24 horas.

20

**EJEMPLO 11 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones anaeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, pero utilizando agua de una factoría hasta alcanzar una  
25 concentración en  $\text{HNO}_3$  de 75-100 mM. El nitrato desapareció completamente en un plazo de 48 horas.

**EJEMPLO 12 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones anaeróbicas, en continuo**

30 Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 6 excepto que no se burbujeaba aire. El fermentador contenía 110 ml de medio y la turbidez del cultivo era del orden de 1 unidad a 660 nm. Agua diluída de una factoría que contenía una concentración de 25 a 30 mM en  $\text{HNO}_3$ , se añadía  
35 a un flujo de 1-20 ml/h. El nitrato en el medio que

rebosaba era indetectable.

#### EJEMPLO 13 Utilización de nitrato como fuente de N

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 4,  
5 pero se utilizaron 2 litros de medio de cultivo y la  
incubación se realizó en un fermentador. Las condiciones  
de operación fueron las siguientes:

pH: 6.5-8.0

Temperatura: 25°C-35°C.

10 Agitación: 400-800 rpm

Sin Aire.

El nitrato desapareció tras 24-30 horas de cultivo.

#### EJEMPLO 14 Tratamiento de un efluente real

15 Un efluente procedente de una fábrica de explosivos  
presentaba las siguientes características:

- Composición:

Nitratos: 200 mg/ml

Sulfatos: 1000 mg/ml

20 - pH: 2.0

Un volumen de 1 litro de dicho efluente se neutralizó  
con NaOH hasta alcanzar un pH de 7.0. 100 ml de este  
efluente se llevaron hasta 1 litro con agua destilada y se  
añadieron los nutrientes y micronutrientes del medio M8,  
25 utilizándose una fuente apropiada de C tal como las  
mencionadas en el Ejemplo 1.

Posteriormente se inoculó un cultivo de las bacterias  
de la cepa Klebsiella oxytoca clón-15, con una turbidez  
inicial de 0.05 a 660 nm. Las condiciones de la incubación  
30 fueron las siguientes:

- agitación: 600 rpm en un incubador orbital

- temperatura: 25°C

- tiempo: 24 h

La evolución de la incubación se siguió midiendo  
35 periódicamente el contenido de nitrato mediante un

electrodo selectivo, comprobándose que al cabo de 24 horas había desaparecido completamente el nitrato.

**EJEMPLO 15      Utilización de nitrito como fuente de N en condiciones aeróbicas**

100 ml de medio mínimo M8 estéril se suplementan con:

- 250  $\mu$ l de solución de micronutrientes A9;
- 6  $\mu$ g de citrato de hierro;
- 100  $\mu$ l de solución de Mg SO<sub>4</sub> 1M;
- 10 - 2 mM NaNO<sub>2</sub>
- 1 g de glicerol

El cultivo se inicia añadiendo una cantidad de bacteria (Klebsiella oxytoca clón-15) tal que se alcanza una turbidez inicial a 660 nm de 0.03 unidades y se incuba a 30°C con agitación (150 rpm en un incubador orbital) y aerobiosis. Tras 24 h de incubación la turbidez del cultivo a 660 nm está comprendida entre 0.5 y 1 unidad y la concentración de nitrito en el medio de cultivo es indetectable mediante análisis químico de sobrenadantes. Es igualmente indetectable la concentración de fuente de Carbono.

**EJEMPLO 16      Utilización de nitrito como fuente de N en condiciones aeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 15, pero utilizando una concentración de 10 mM de nitrito sódico. El nitrito desapareció completamente en un plazo de 48 horas.

**EJEMPLO 17      Utilización de nitrito como fuente de N en condiciones aeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 15, pero se utilizaron 2 litros de medio de cultivo y la incubación se realizó en un fermentador. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

pH: 6.5-8.0

Temperatura: 25°C-35°C.

Agitación: 400-800 rpm

Aire: 0.5 volúmenes/minuto.

5 El nitrito desapareció tras 24-30 horas de cultivo.

**EJEMPLO 18 Utilización de nitrito como fuente de N en anaerobiosis**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo  
10 15, pero utilizando condiciones anaeróbicas. El nitrito desapareció completamente en un plazo de 24 horas.

**EJEMPLO 19 Utilización de nitrito como fuente de N en condiciones anaeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo  
15 18, pero utilizando una concentración de 10 mM en nitrito sódico. El nitrito desapareció completamente en un plazo de 48 horas.

**EJEMPLO 20 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas**

100 ml de medio mínimo M8 se suplementan con:

- 250 µl de solución de micronutrientes A9;
- 25 - 6 µg de citrato de hierro;
- 100 µl de solución de Mg SO<sub>4</sub> 1M;
- 20 mM KNO<sub>3</sub>; y
- 1.0 g de etilenglicol.

El cultivo se inicia añadiendo una cantidad de  
30 bacteria (Klebsiella oxytoca clón AH1) tal que se alcanza una turbidez inicial a 660 nm de 0.03 unidades y se incuba a 30°C con agitación (150 rpm en un incubador orbital) y aerobiosis. Tras 48 horas de incubación la turbidez del cultivo a 660 nm está comprendida entre 5 y 15 unidades y  
35 la concentración de nitrato en el medio de cultivo es

indetectable mediante análisis selectivo con un electrodo de nitrato de sobrenadante. Es igualmente indetectable la concentración de fuente de C.

5 EJEMPLO 21 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 20, pero utilizando nitrato potásico en una concentración de 225 mM. El nitrato desapareció completamente en un  
10 plazo de 48 horas.

EJEMPLO 22 Utilización de nitrato como fuente de N en condiciones aeróbicas, en continuo

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo  
15 20, pero utilizando un sistema de adición en continuo de nitrato. El fermentador contenía 110 ml de medio y la turbidez del cultivo era del orden de 3 unidades a 660 nm. Agua sin diluir de una factoría suministraba de 200 a 400 mM de  $\text{HNO}_3$  y se añadía a un flujo de 1-5 ml/h. El volumen  
20 de aire era de 0.5 volúmenes/min. El nitrato en el medio que rebosaba era indetectable.

Descrito el objetivo de la presente invención se declara  
25 que lo que constituye la esencialidad de la misma es lo que se declara en las siguientes:

## REIVINDICACIONES

1. Klebsiella oxytoca clón-15, depositada en la CECT con el n° de accesión CECT 4460, capaz de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de nitrógeno bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas.
2. Klebsiella oxytoca clón AH1, depositada en la CECT con el n° de accesión CECT 4500, capaz de utilizar nitratos y/o nitritos como fuente de nitrógeno y etilenglicol como fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas.
3. Procedimiento para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos contenidos en efluentes industriales o en aguas contaminadas con dichos compuestos, caracterizado porque comprende las etapas de:
  - a) neutralizar el efluente o el agua contaminada a tratar;
  - b) añadir los nutrientes necesarios para el funcionamiento óptimo del procedimiento;
  - c) inocular el efluente o el agua contaminada a tratar con un cultivo de alguno de los microorganismos citados en las reivindicaciones 1 ó 2 hasta la desaparición de los nitratos y/o nitritos contenidos en dichos efluente o agua contaminada; y
  - d) retirar dichos microorganismos y verter los efluentes y las aguas depuradas.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el efluente a tratar es un efluente procedente de una fábrica productora de explosivos o de una fábrica que utilice o produzca

nitratos y/o nitritos.

5. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el efluente o el agua a tratar se neutraliza por adición de un álcali hasta alcanzar un pH comprendido entre 6.0 y 10.5, cuando se utilizan bacterias de la cepa Klebsiella oxytoca clón-15.
6. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el efluente o el agua a tratar se neutraliza por adición de un álcali hasta alcanzar un pH comprendido entre 6.0 y 8.0, cuando se utilizan bacterias de la cepa Klebsiella oxytoca clón AH1.
7. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque los microorganismos retirados, pueden ser reutilizados en un nuevo ciclo de tratamiento de efluentes o de aguas contaminadas.
8. Procedimiento para la eliminación biológica de nitratos y/o nitritos contenidos en suelos superficiales contaminados con dichos compuestos, caracterizado porque comprende las etapas de:
- a) efectuar una inyección primaria con un cultivo de los microorganismos de las reivindicaciones 1 ó 2 en el suelo a tratar; y
- b) efectuar inyecciones sucesivas de dichos microorganismos hasta que el suelo quede libre de nitratos y/o nitritos.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque el suelo a tratar se inyecta con dichos microorganismos hasta alcanzar una densidad del orden de  $10^5$  microorganismos por  $\text{cm}^2$  de suelo.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/ES 94/00069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C02F3/34 C02F3/12 B09C1/10 C12N1/20 //(C12N1/20,  
 C12R1:22)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C02F B09C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 15440 (IDAHO RESEARCH FOUNDATION, INC) 17 October 1991 see claims 1,2,6,9-11,25 ----	1-3,5,6, 8,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 7, 13 February 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 54294g, WONG, S.H. 'effects of carbon sources on nitrate assimilation of kebsiella species' page 374 ; see abstract & MICROBIOS LETT., vol.38, no.150, 1988 pages 55 - 60 ----- -/-	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 November 1994

Date of mailing of the international search report

18. 11. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gonzalez Arias, M



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/ES 94/00069

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 8912, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D04, AN 89-091696 &amp; SU,A,1 423 585 (MMAKEEVKA ENG CONS) 15 September 1988 see abstract</p> <p>-----</p>	1-9

### Information on patent family members

**PCT/ES 94/00069**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9115440	17-10-91	AU-B- 651586	28-07-94
		AU-A- 7773491	30-10-91
		EP-A- 0527959	24-02-93

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Soli internacional N°

PCT/ES 94/00069

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN  
CIP 6 C02F3/34 C02F3/12 B09C1/10 C12N1/20 //(C12N1/20,  
C12R1:22)

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación segundo de los símbolos de clasificación)  
CIP 6 C02F B09C

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO,A,91 15440 (IDAHO RESEARCH FOUNDATION, INC) 17 Octubre 1991 ver reivindicaciones 1,2,6,9-11,25 ---	1-3,5,6, 8,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 7, 13 Febrero 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 54294g, WONG,S.H. 'effects of carbon sources on nitrate assimilation of kebsiella species' página 374 ; ver resumen & MICROBIOS LETT., vol.38, num.150, 1988 páginas 55 - 60 --- -/-	1-9

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

\* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

8 Noviembre 1994

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

18. 11. 94

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Gonzalez Arias, M

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Sol. J Internacional N°

PCT/ES 94/00069

## C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	<p> <b>DATABASE WPI</b>  <b>Section Ch, Week 8912,</b>  <b>Derwent Publications Ltd., London, GB;</b>  <b>Class D04, AN 89-091696</b>  <b>&amp; SU,A,1 423 585 (MMAKEEVKA ENG CONS) 15</b>  <b>Septiembre 1988</b>  <b>ver resumen</b> </p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9

### Información sobre miembros de la familia de patentes

**PCT/ES 94/00069**

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO-A-9115440	17-10-91	AU-B- 651586	28-07-94
		AU-A- 7773491	30-10-91
		EP-A- 0527959	24-02-93
-----			

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION [logo]  
International Office  
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED IN ACCORDANCE WITH THE PATENT  
COOPERATION TREATY

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : C02F 3/34 3/12, B09C, C12N 1/20// (C12N 1/20, C12R 1:22)	A1	(11) International Publication Number: <b>WO 95/01311</b>  (43) Date of International Publication: 12 January 1995 (12.01.95)
(21) International Application: PCT/ES94/00069  (22) Date of International Presentation: 1 July 1994 (01.07.94)  (30) Data related to Priority: P 9301496       2 July 1993 (02.07.93) ES P 9401427       30 June 1994 (30.06.94) ES  (71) Applicant (for all designated states except the US): UNION ESPANOLA DE EXPLOSIVOS, S.A. (ES/ES); Avenida del Partenón, 16, Campo de Las Naciones, E-28042 Madrid (ES)  (72) Inventors: and (75) Inventor/Applicants: (US only): RAMOS MARTIN, José Luis [ES/ES]; Los Rosales, 14, D- 18191 Pinos Genil (ES). PINAR LARRUBIA, Guadalupe [ES/ES]; Parque del Genil, Edificio Granate 4, B-2, E-18004 Granada (ES. DUQUE MARTIN DE OLIVA, Estrella [ES/ES]; Los Rosales, 14, E-18191 Pinos Genil (ES), HAIDOUR, Ali [MA/ES] Casillas del Prats, 12 E-18002 Granada (ES).  (74) Attorney: GARCIA CABRERIZO, Francisco; Vitruvio, 23, E-28006 Madrid (ES)		(81) Designated States: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, FL, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, UA, US, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <p style="text-align: center;"><b>Published</b></p> With international search information. Before the expiration of the time period anticipated for modification of the claims. To be published again if such modifications are received.
(54) Title: PROCESS FOR THE BIOLOGICAL ELIMINATION OF NITRATES AND/OR NITRITES USING STRAINS OF <i>KLEBSIELLS OXYTOCA</i> .		
(57) Abstract  Two new strains of <i>Klebsiella oxytoca</i> have been isolated, identified as <i>K. oxytoca</i> clone-15 and clone AH1, which are capable of using nitrates and/or nitrites as nitrogen source and, consequently may be used for the biological elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluents, waters and grounds contaminated of cultures of said strains. The strain <i>K. oxytoca</i> clone-15 is capable of using, both in aerobic and anaerobic conditions, nitrates and/or nitrites present in a concentration up to 100 mM, whereas the strain <i>K. oxytoca</i> clone AH1 is capable of using, in aerobic conditions, nitrates present in a concentration up to 400 mM. The process applies to the elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluents, waters and grounds which have been contaminated.		

## FOR INFORMATION ONLY

Codes used to identify the States that belong to the PCT on the title pages of the brochures in which the international applications within the scope of PCT are published.

AT	Austria	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GR	Greece	NE	Niger
BE	Belgium	HU	Hungary	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NO	Norway
BG	Bulgaria	IT	Italy	NZ	New Zealand
BJ	Benin	JP	Japan	PL	Poland
BR	Brazil	KE	Kenya	PT	Portugal
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RO	Romania
CA	Canada	KP	Popular Democratic Republic of Korea	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Sweden
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CN	China	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	SN	Senegal
CZ	Czech Republic	LV	Letonia	TD	Chad
DE	Germany	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
ES	Spain	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
FI	Finland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
FR	France			US	United States of America
GA	Gabon			UZ	Uzbekistan
				VN	Viet Nam

## PROCEDURE FOR THE BIOLOGICAL ELIMINATION OF NITRATES AND NITRITES USING STRAINS OF KLEBSIELLA OXYTOCA

### SCOPE OF THE INVENTION

The invention refers to new strains of Klebsiella oxytoca adapted for use in a process for the biological elimination of nitrates and/or nitrites. In particular the invention provides a process for the elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial or municipal effluents and soils through the use of strains of Klebsiella oxytoca capable of using these compounds as nitrogen sources, in this way preventing the environmental contamination caused by these compounds.

### PRIOR ART

Industry in general and the explosives industry in particular manufacture large quantities of various compounds into which nitro groups have been substituted for use as explosives and propellants. Rinse water from plants where nitration of various compounds takes place contain elevated quantities of nitrates and detectable levels of nitrites which, if not treated appropriately, constitute a source of environmental contamination, and for this reason should be eliminated since the former are toxic in moderate concentrations and the latter are mutagenic agents, and therefore agents suspected of causing cancer.

Wastewater from explosives factories, especially those that produce 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), nitroethylene glycol and nitroglycerine, have low levels of the nitro-organics mentioned and high levels of nitrates in addition to an acidic pH (values between 1 and 2).

Current treatment systems for effluents from plants where explosives are manufactured primarily include neutralization of the water and the infinite dilution of the effluent with water. This treatment leads to a problem of continuous addition of contaminants to rivers, groundwater and soils and for this reason is inappropriate.

Microbiology in general and biotechnology in particular may offer a biological alternative to the elimination of nitrates and nitrites by their use as a source of N for appropriate microorganisms. Thus many studies were reviewed for the possibility of biological treatment of effluents that contain nitrates. Among these studies, the following should be mentioned:

- Kaplan et al. (International Biodeterioration. 23:233 - 248, 1987) used indefinite microorganisms and for this reason generated problems with reproducing the treatment.
- Henson Christensen and Harremoes (Prog. Wat. Tech. 8: 509 - 555, 1977) review the status of the technique in treatment plants with low concentrations of nitrate;
- du Toit and Davies (Water Res. 7: 489 - 500, 1973) study the elimination of nitrates in continuous flow with domestic waste with low concentration of nitrate;



- Hochstein and Tomlinson (Annu. Rev. Microbiol. 42: 231 - 261) review the process of denitrification from various points of view; and
- Ye et al. (Applied Environmental Microbiology 59: 250 - 254, 1993) show the versatility of enzymes involved in denitrification processes.

Therefore it would be convenient to use microorganisms capable of using nitrates and/or nitrites present in effluents from explosives manufacturing plants as a source of N for the goal of biological elimination of these constituents to overcome the problems cited previously and to prevent the environmental problems associated with the uncontrolled disposal or inadequate treatment of these effluents.

Consequently, one goal of this invention consists of the isolation and characterization of microorganisms capable of eliminating nitrates and/or nitrites. Such organisms that belong to two strains of Klebsiella oxytoca constitute an additional purpose of this invention.

Another additional purpose of this invention is a process for the biological elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluents, municipal wastewater or soils through the use of the microorganisms provided by this invention.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention provides new strains of Klebsiella oxytoca capable of using nitrates and/or nitrites as a nitrogen source as well as a process for the biological elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluents, municipal wastewater and soils through the use of strains of Klebsiella oxytoca provided by this invention.

As a summary, the invention contains, on the one hand, the isolation and characterization of microorganisms capable of using nitrates and/or nitrites as a N source, and, on the other hand, the use of the isolated microorganisms for the elimination of nitrates and/or nitrites present in effluents from industrial plants, in municipal wastewater and soils contaminated by these compounds.

### 1. Isolation and characterization of microorganisms capable of using nitrates and nitrites.

#### 1.1 Isolation

For the isolation of microorganisms capable of using nitrate as a source of N, the following process was used. A sample of a soil collected near a plant that generates effluents that contain nitrates was suspended in a minimal culture media of the M8 type [medium M8 is identical to medium M9 except that the nitrogen ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) source is omitted.] The composition of medium M9 is described in Abril et al., Journal of Bacteriology, Vol. 171, No. 12, pages 6782 - 6790, (1989). A volume of nitrate-rich effluent water from the factory and an appropriate amount of a C source are added to this suspension. C sources that can be used are sugar, preferably fructose or glucose or an appropriate organic acid, preferably acetic or succinic acid or alcohols such as glycerine

and ethylene glycol. Then the resulting suspension is incubated at temperatures between 15°C and 42°C, preferably between 25°C and 30°C, with optional agitation, and after a week of incubation, appropriate dilutions are planted on selective solid media plates such as those containing M8, agar noble, potassium nitrate (20 - 100 mM) and a source of C. After an incubation period ranging from 24 hours to a week, the isolated colonies are purified and their capacity to grow at the expense of nitrates and/or nitrites is tested in a liquid medium. In Example 1 the isolation of bacteria capable of using nitrate as a N source is discussed, in particular that of the two strains of Klebsiella oxytoca of this invention.

## 1.2 Characterization of the isolated microorganisms.

Following type analysis (API Test 20E, of Biomerieux, France, catalog reference no. 20.100) it was possible to verify that the isolated organisms capable of using nitrates and nitrites as a N source were bacteria belonging to the genus Klebsiella. Two of the most efficient isolated strains were Klebsiella oxytoca clone-15 and Klebsiella oxytoca clone AH1, which have been deposited in the Spanish Collection of Type Cultures (CECT) Valencia, Spain, on 15 June 1993 and 10 June 1994, as entry numbers CECT 4460 and CECT 4500, respectively.

The isolated bacteria have a bacillar shape and present no pigmentation when they are cultivated in minimal media plates or LB-rich media plates (Maniatis et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982). One of the isolated strains, Klebsiella oxytoca clone-15 in type M8 minimal media can use fructose, glucose, acetic acid, succinic acid and glycerol as a C source and ammonia, nitrate or nitrite as an N source, under aerobic and anaerobic conditions, whereas the other isolated strain, called Klebsiella oxytoca clone AH1, can use nitrate and nitrite as a N source and ethylene glycol as a C source under aerobic conditions.

The common taxonomic characteristics of the Klebsiella oxytoca clone-15 and Klebsiella oxytoca clone AH1 strains are the following:

### 1. Morphological Features

Form: Bacillar  
Mobility: Not mobile  
Spores: Do not form  
Gram Stain: Negative

### 2. Culture Characteristics

Culture in MacConkey media: Growth  
Placed on plates of agar nutrient: Growth  
Placed in an inclined tube of agar nutrient: Growth

### 3. Physiological Features

pH: 6.0 - 10.5 (for Klebsiella oxytoca clone-15)  
6.0 - 8.0 (for Klebsiella oxytoca clone AH1)

Temperature: 15°C - 42°C

Behavior in O<sub>2</sub>:

Both are facultative anaerobics, but the Klebsiella oxytoca clone AH1 strain uses only ethylene glycol as a C source in aerobiosis.

β-galactosidase: Positive

Arginine dehydrolase: Negative

Lisine decarboxylase: Positive

Ornithine decarboxylase: Negative

Utilization of citrate: Positive

H<sub>2</sub>S production: Negative

Urease: Positive

Tryptophan deaminase: Negative

Indol production: Positive

Gelatinase: Negative

Fermentation/Oxidation of sugars:

Glucose: Positive

Manitol: Positive

Inositol: Positive

Sorbitol: Positive

Rhamnose: Positive

Saccharose: Positive

Melibiose: Positive

Amigdaline: Positive

Arabinose: Positive

Cytochrome oxidase: Negative

NO<sub>2</sub> production: Positive

Reduction to N<sub>2</sub> gas: Positive

The Klebsiella oxytoca clone-15 strain is capable of growing in the presence of high and low concentrations of nitrates and/or nitrites. A characteristic of this strain is the fact that it is capable of growing in the presence of relatively high concentrations of nitrates (up to 100 mM) which gives it a very unusual characteristic and constitutes a fundamental advantage for its application to the elimination of nitrates and/or nitrites present in effluents, wastewater and soils.

On the other hand, the Klebsiella oxytoca clone-AH1 strain is capable of growing in the presence of high concentrations of nitrates, with concentrations on the order of 225 mM in watertight systems which are very appropriate for the elimination of nitrates and/or nitrites present in effluents, wastewater and soils.

Because the method of nitrate assimilation includes reduction from nitrate to nitrite and ammonia, among other reactions, the possibility that these isolated strains may

be capable of assimilating nitrites was studied, and it was observed that these strains are capable of using nitrites as a N source under aerobic and anaerobic conditions [Klebsiella oxytoca clone-15] as described in Examples 2 to 19, and under aerobic conditions [Klebsiella oxytoca clone-AH1] as described in Examples 20 to 22.

When isolated and purified, the colonies of bacteria capable of using nitrates and/or nitrites as a N source can be used to eliminate these compounds when they are present in effluents from industrial plants, municipal wastewater and soils.

## 2. Process of biological elimination of nitrates and/or nitrites.

A primary application of the bacteria in this invention is their use in a process of biological elimination of nitrates and/or nitrites contained in industrial effluent. This procedure includes the following steps.

- a) neutralization of the effluent to be treated;
- b) supplementing of nutrients necessary for the optimal functioning of the process;
- c) inoculation of the effluent to be treated with cultures of microorganisms capable of using nitrates and/or nitrites until they disappear;
- d) removal of microorganisms that can be re-used in a new effluent treatment cycle, if desired; and
- e) disposal of the purified water.

As can be seen, the procedure begins with a step of neutralizing the effluent. The effluent that can be purified by means of this procedure can be effluents of any industrial process in which nitrates and/or nitrites are used or produced, such as effluents from explosives fabrication plants. In addition, any type of water contaminated with nitrates and/or nitrites can be treated.

In general, wastewater from explosives fabrication plants are acidic waters that can be neutralized by adding any alkali, preferably a hydroxide, carbonate or bicarbonate of an alkali or alkali earth metal in order to cause this water to reach a pH between 6.0 and 10.5 after neutralization. This pH interval is sufficient when the strain that is used is Klebsiella oxytoca clone 15, whereas if the Klebsiella oxytoca clone AH1 is used it is more convenient to neutralize the effluent and maintain the pH of same within an interval between 6.0 and 8.0, since this is its activation interval.

Afterwards and after analysis of the neutralized effluent, necessary nutrients such as phosphate or any other nutrient or micro-nutrient that may be necessary for the optimal functioning of the process is added. As an example, suitable quantities of the A9 micro-nutrient solution whose composition is described in Abril et al, cited above, can be added along with appropriate quantities of Fe, Mg, Co and Mo (on the order of a micromole). In any case, the choice and quantity of nutrients and micro-nutrients to be added will be a function of the composition of the effluent to be treated and of the microbiological demand. In addition, a C source suitable for the strain that will be used in the process, such as those mentioned above, is added.

Afterwards, the neutralized effluent is inoculated and duly supplemented with a culture of bacteria provided by this invention (Klebsiella oxytoca clone 15 or Klebsiella oxytoca clone AH1). The bacterial concentration can be between 0.01 and 0.1 absorption units at 660 nm per ml of culture, preferably around 0.03 absorption units at 660 nm per ml of culture.

Incubation should be done at a temperature between 20°C and 30° C with a contribution of up to 2 liters of air per liter of culture if the procedure is performed using Klebsiella oxytoca clone AH1, whereas no air can be added or up to 2 liters of air per liter of culture can be added if the procedure uses Klebsiella oxytoca clone 15. During the course of incubation, the quantity of nitrate and nitrite present in the effluent or water to be purified is measured on a periodic basis with a nitrate specific electrode (for example, a nitrate electrode of the Crison type) and by means of an extremely sensible chemical test for the detection of nitrite (Snell and Snell, Colorimetric Methods of Analysis, Vol. 3, pp. 804-805, Van Nostrand Co., Inc., New York, 1949) respectively.

Afterwards, the bacteria are removed by flocculation or any other methods that permits their re-use in a new process, if desired, and the purified water that can now be freely disposed of is removed.

This process can be done continuously or under airtight conditions also in large-dimension ponds or in fermenters. When it is done continuously, the flow and composition of the effluent at entry and exit should be adequately regulated as well as the concentration of bacterial culture and the addition of necessary nutrients and micro-nutrients.

A second application of the bacteria in this invention consists of their use in a procedure for the biological elimination of nitrates and/or nitrites in surface soils contaminated with these compounds. This process includes the following steps:

- a) primary injection of a culture of microorganisms capable of using nitrates and/or nitrites; and
- b) successive injections of cultures of microorganisms cited above until the soil is free of nitrates and/or nitrites.

The injection of microorganisms is done to reach high cellular densities in the soils, on the order of  $10^5$  bacteria per  $\text{cm}^2$  of soil to facilitate the elimination of the contaminant. If necessary, phosphates and a carbon source that facilitates survival are added.

Finally, a third application of the bacteria of this invention consists of their use in the elimination of nitrates and/or nitrites contained in wastewater following a process similar to that previously described for the elimination of nitrates and nitrites in industrial effluent.

The advantages derived from the procedures of biological elimination of nitrates and/or nitrites in this invention can be summarized as:

1. A high specificity in the elimination of nitrates and nitrites;
2. A broad interval of concentrations of nitrate, nitrite or their mixtures, in particular the function at concentrations of:

0.01 to 100 mM of nitrate and from 0.01 to 50 mM of nitrite or their mixtures, when the process is done using bacteria of the strain Klebsiella oxytoca clone 15, or of

0.01 to 225 mM nitrate in airtight conditions and with supplementation of up to 400 mM of nitrate continuously controlling the rate of supply when the procedure is done using bacteria of the strain Klebsiella oxytoca clone AH1; and

3. They have high versatility, since they can be used in situ to eliminate nitrates and/or nitrites contained in effluent from industrial plants, wastewater and soils.

Some examples that serve to illustrate particular realizations of this invention are listed below. These examples should not be taken as limiting the scope of the invention.

EXAMPLE 1. Isolation of the bacteria (Klebsiella oxytoca clone 15 and Klebsiella oxytoca clone AH1).

A 10 gram sample of a soil from the Páramo de Masa (Burgos) was suspended in a minimal culture media of type M8, in a ratio of 1:10 (per volume). Then  $\text{KNO}_3$  was added to the media to reach a concentration of 20 mM or 100 mM and three identical aliquots were taken from the suspension. To the three aliquots, the following were added:

SAMPLE	GLYCEROL (g/l)	ETHYLENE GLYCOL (g/l)	FRUCTOSE (g/l)
I	5	--	--
II	--	5	--
III	--	--	5

Resulting suspensions I to III were incubated at a temperature between 25°C and 30°C for a week, with optional agitation. Then, appropriate dilutions of these suspensions were planted on plates of selective solid media made up of M8 media, 1.5% agar noble (per volume) and

20 mM  $\text{KNO}_3$  + 5 g/l glycerol (sample I)  
 100 mM  $\text{KNO}_3$  + 10 g/l of glycerol (sample I)  
 20 mM  $\text{KNO}_3$  + 5 g/l ethylene glycol (sample II)  
 100 mM  $\text{KNO}_3$  + 5 g/l of ethylene glycol (sample II)  
 20 mM  $\text{KNO}_3$  + 5 g/l fructose (sample III)

100 mM KNO<sub>3</sub> + 5 g/l of fructose (sample III)

After an incubation period of 24 hours to a week, the isolated colonies were purified and their phenotype was verified by culturing them in the media indicated above.

After analysis by API Kit 20E (Biomerieux) the isolated bacteria were classified as Klebsiella oxytoca. The two most effective strains were called Klebsiella oxytoca clone 15 and Klebsiella oxytoca clone AH1, which present the characteristics mentioned above in the description. Individual cultures of these strains were deposited with the CECT on 15 June 1993 and 10 June 1994, with the entry numbers CECT 4460 and CECT 4500 respectively.

EXAMPLE 2. Use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

100 ml of M8 minimal media are supplemented with:

- 250 µl of A9 micro-nutrient solution;
- 6 µg of iron citrate;
- 100 µl of 1M solution of MgSO<sub>4</sub>;
- 20 mM KNO<sub>3</sub>; and
- 1 g of glycerol.

The culture begins by adding a quantity of bacteria (Klebsiella oxytoca clone 15) so that it reaches an initial turbidity of 0.03 units at 660 nm and is incubated at 30°C with agitation (150 rpm in an orbital incubator) and aerobiosis. After 24 hours of incubation, the turbidity of the culture at 660 nm is between 1 and 2 units and the nitrate concentration in the culture medium is undetectable by selective analysis of the supernatant with a nitrate electrode. The concentration of the C source is equally undetectable.

EXAMPLE 3. Use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 2 was repeated using potassium nitrate at a concentration of 100 mM. The nitrate disappeared completely within a period of 48 hours.

EXAMPLE 4. Use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 2 was repeated using water from a factory such that the final concentration of HNO<sub>3</sub> was 25 - 30 mM. The nitrate disappeared completely within a period of 24 hours.

EXAMPLE 5. Use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 2 was repeated using water from a factory such that the final concentration of  $\text{HNO}_3$  was 75 - 100 mM. The nitrate disappeared completely within a period of 48 hours.

**EXAMPLE 6.** Continuous use of nitrate as a N source under aerobic conditions

The procedure described in Example 2 was repeated using a system of continuous addition of nitrate. The fermenter contained 110 ml of medium and the turbidity of the culture was on the order of 3 units at 660 nm. Factory water diluted to provide from 25 to 30 mM of  $\text{HNO}_3$  was added in a flow of 1-20 ml/h. The volume of air was 0.5 volumes/min. The nitrate in the overflowing media was undetectable.

**EXAMPLE 7.** Use of nitrate as a N source.

The procedure described in Example 4 was repeated using 2 liters of culture medium and the incubation was done in a fermenter. The operating conditions were the following:

pH: 6.5 - 8.0.

Temperature: 25°C - 35°C.

Stirring: 400 - 800 rpm.

Air: 0.5 volumes/minute.

The nitrate disappeared after 24 - 30 hours of culture.

**EXAMPLE 8.** Use of nitrate as a N source in anaerobiosis.

The procedure described in Example 2 was repeated under anaerobic conditions. The nitrate disappeared completely within 24 hours.

**EXAMPLE 9.** Use of nitrate as a N source under anaerobic conditions.

The procedure described in Example 8 was repeated using potassium nitrate in a concentration of 100 mM. The nitrate disappeared completely within a period of 48 hours.

**EXAMPLE 10.** Use of nitrate as a N source under anaerobic conditions.

The procedure described in Example 8 was repeated using factory water to reach a  $\text{HNO}_3$  concentration of 25 - 30 mM. The nitrate disappeared completely within a period of 24 hours.

**EXAMPLE 11.** Use of nitrate as a N source under anaerobic conditions.

The procedure described in Example 8 was repeated using factory water to reach a  $\text{HNO}_3$  concentration of 75 - 100 mM. The nitrate disappeared completely within a period of 48 hours.



EXAMPLE 12. Continuous use of nitrate as a N source under anaerobic conditions.

The procedure described in Example 6 was repeated except that no air was bubbled through. The fermenter contained 110 ml of medium and the turbidity of the culture was on the order of 1 unit at 660 nm. Diluted factory water that contained a concentration of 25 to 30 mM of  $\text{HNO}_3$  was added at a rate of 1-20 ml/h. The nitrate in the medium that was overflowing was undetectable.

EXAMPLE 13. Use of nitrate as a N source.

The procedure described in Example 4 was repeated using 2 liters of culture media and incubation took place in a fermenter. The operating conditions were the following:

pH: 6.5 - 8.0

Temperature: 25°C - 35°C

Agitation: 400 - 800 rpm

No air

The nitrate disappeared after 24 - 30 hours of culture.

EXAMPLE 14. Treatment of an actual effluent.

An effluent from an explosives factory presented the following characteristics:

Composition:

Nitrates: 200 mg/ml.

Sulfates: 1000 mg/ml

pH: 2.0

A volume of 1 liter of this effluent was neutralized with NaOH until reaching a pH of 7.0. 100 ml of this effluent was brought up to 1 liter with distilled water and nutrients and micro-nutrients of medium M8 were added using an appropriate C source, such as those mentioned in Example 1.

Later the bacteria culture of the Klebsiella oxytoca clone 15 was inoculated with an initial turbidity of 0.05 at 660 nm. The incubation conditions were the following:

Agitation: 600 rpm in an orbital incubator

Temperature: 25°C

Time: 24 hours

The evolution of the incubation was monitored by periodically measuring the nitrate content with a selective electrode, confirming that after 24 hours the nitrate had completely disappeared.

EXAMPLE 15. Use of nitrite as a N source under aerobic conditions.

100 ml of sterile minimal media M8 is supplemented with:

- 250 µl of A9 micro-nutrient solution;
- 6 µg of iron citrate;
- 100 µl of 1M Mg SO<sub>4</sub> solution;
- 2 mM NaNO<sub>2</sub>
- 1 g of glycerol

The culture begins by adding a quantity of bacteria (Klebsiella oxytoca clone 15) so that it reaches an initial turbidity of 0.03 units at 660 nm and it is incubated at 30°C with agitation (150 rpm in an orbital incubator) and aerobiosis. After 24 hours of incubation, the turbidity of the 660 nm culture is between 0.5 and 1 unit and the concentration of nitrite in the culture medium is undetectable by chemical analysis of the supernatants. The concentration of the carbon source is also undetectable.

EXAMPLE 16. Use of nitrite as N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 15 is repeated with a 10 mM concentration of sodium nitrite. The nitrite disappeared completely within a period of 48 hours.

EXAMPLE 17. Use of nitrite as a N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 15 was repeated using 2 liters of culture media and incubation conducted in a fermenter. The operating conditions were the following:

pH: 6.5 - 8.  
Temperature: 25°C - 35°C.  
Agitation: 400 - 800 rpm.  
Air: 0.5 volumes/minute.

The nitrite disappeared after 24 - 30 hours of culture.

EXAMPLE 18. Use of nitrite as a N source in anaerobiosis

The procedure described in Example 15 was repeated under anaerobic conditions. The nitrite disappeared completely in a period of 24 hours.

EXAMPLE 19. Use of nitrite as a N source under anaerobic conditions.

The procedure described in example 18 is repeated using a 10 mM concentration of sodium nitrite. The nitrite disappeared completely within a period of 48 hours.

EXAMPLE 20. Use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

100 ml of the M8 minimal media is supplemented with

- 250  $\mu$ l of A9 micro-nutrient solution;
- 6  $\mu$ g of iron citrate;
- 100  $\mu$ l of 1M Mg SO<sub>4</sub> solution;
- 20 mM KNO<sub>3</sub>; and
- 1.0 g of ethylene glycol.

The culture is begun by adding a quantity of bacteria (Klebsiella oxytoca clone AH1) so that it reaches an initial turbidity of 0.03 units at 660 nm and is incubated at 30°C with agitation (150 rpm in an orbital incubator) and aerobiosis. After 48 hours of incubation, the turbidity of the 660 nm culture is between 5 and 15 units and the concentration of nitrate in the culture medium is undetectable by selective analysis with a nitrate electrode in the supernatant. The concentration of the C source is equally undetectable.

EXAMPLE 21. Use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 20 was repeated using potassium nitrate at a concentration of 225 mN. The nitrate disappeared completely in a period of 48 hours.

EXAMPLE 22. Continuous use of nitrate as a N source under aerobic conditions.

The procedure described in Example 20 was repeated using a continuous system of nitrate addition. The fermenter contained 110 ml of medium and the turbidity of the culture was on the order of 3 units at 660 nm. Undiluted factory water supplied from 200 to 400 mM of HNO<sub>3</sub> and it was added at a rate of 1 - 5 ml/h. The volume of air was 0.5 volumes/minute. The nitrate in the medium that overflowed was undetectable.

Having described the purpose of this invention, it is declared that the essence of this invention is stated in the following:

#### CLAIMS

1. Klebsiella oxytoca clone-15, deposited at the CECT under the entry number CECT 4460, characterized by the fact that it is capable of using nitrates and/or nitrites as a nitrogen source under aerobic and anaerobic conditions.
2. Klebsiella oxytoca clone AH1, deposited at the CECT under the entry number CECT 4500, characterized by the fact that it is capable of using nitrates and/or nitrites as a nitrogen source and ethylene glycol as a source of carbon under aerobic conditions.

3. Procedure for the biological elimination of nitrates and nitrites contained in industrial effluent or water contaminated with these compounds, characterized by including the stages of:

- a) Neutralization of the effluent or the contaminated water to be treated;
- b) Addition of the nutrients necessary for the optimal functioning of the procedure;
- c) Inoculation of the effluent or contaminated water to be treated with a culture of one of the microorganisms cited in Claims 1 or 2 until the disappearance of the nitrates and/or nitrites contained in this effluent or contaminated water.
- d) Removal of the organisms and disposal of the effluents and the purified water.

4. Procedure under Claim 3, characterized by the fact that the effluent to be treated is an effluent from an explosives production factory or a factory that uses or produces nitrates and/or nitrites.

5. Procedure under Claim 3, characterized by the fact that the effluent or the water to be treated is neutralized by the addition of an alkali until it reaches a pH between 6.0 and 10.5, when bacteria of the strain Klebsiella oxytoca clone-15 is used.

6. Procedure under Claim 3, characterized by the fact that the effluent or the water to be treated is neutralized by the addition of an alkali until it reaches a pH between 6.0 and 8.0 when bacteria of the strain Klebsiella oxytoca clone AH1 is used.

7. Procedure under Claim 3, characterized by the fact that withdrawn microorganisms can be reused in a new cycle of effluent or contaminated water treatment.

8. Procedure for the biological elimination of nitrates and or nitrites contained in surface soils contaminated with these compounds, characterized by the fact that it contains the stages of:

- a) Performing a primary injection with a culture of microorganisms in Claims 1 or 2 in the soil to be treated; and
- b) Performing successive injections of these microorganisms until the soil is free of nitrates and/or nitrites.

9. Procedure according to Claim 8, characterized by the fact that soil to be treated is injected with these microorganisms until they reach a density on the order of  $10^5$  microorganisms per  $\text{cm}^2$  of soil.